乙二醇缩水甘油醚交联海藻酸钠-羧甲基纤维素钠固定化脂肪酶

徐珊[3]，李任强[3]，张继福[4]，张云[1,2]，孙爱君[1,2]，胡云峰[1,2*]

1 中国科学院南海海洋研究所，中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室，广州 510301

2 中国科学院南海海洋研究所，广东省海洋药物重点实验室，广州 510301

3 暨南大学，生物工程学系，广州 510632

4 广东省中医院，广州 510120

摘要：以海藻酸钠、羧甲基纤维素钠（CMC）为载体，分别以乙二醇缩水甘油醚（EGDE）和戊二醛为交联剂，采用包埋交联法对脂肪酶进行固定化，结果显示 EGDE 的交联效果要优于戊二醛，添加 EGDE 的固定化酶酶活最好。得到制备固定化酶的最优方案为海藻酸钠 2.5%，CMC 浓度 1.5%，给酶量 800 U/mL 复配载体，氯化钙 5%，以 0.02%的 EGDE 交联固定 30 min，由此制备得到酶活约为 380 U/g 的固定化酶，酶活收率约为 50.09%。固定化酶的最适反应 pH 为 8.5，比游离酶增大 0.5 个单位；最适反应温度是 45℃，比游离酶提高 5℃；耐热性能变好，且重复使用 7 次后仍能保持 60%左右的相对酶酶活。

关键词：海藻酸钠；羧甲基纤维素钠；乙二醇缩水甘油醚；固定化酶

Ethylene glycol diglycidyl ether cross-linked with sodium alginate-carboxymethyl cellulose to immobilize lipase

XU Shan[3], LI Ren-qiang[3], ZHANG Ji-fu[4], ZHANG Yun[1,2], SUN Ai-jun[1,2], Hu Yun-feng[1,2*]

1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301

2.Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301

3. Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632

4. Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangdong Province, Guangzhou, 510120

Abstract: In this study, sodium alginate and carboxymethyl cellulose sodium were used as the carriers to immobilize lipase, using ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE) and glutaraldehyde as the cross-linking agent, respectively. The results showed that EGDE was superior to glutaraldehyde and was the most effective cross-linking agent. The optimal conditions for lipase immobilized were as follows: sodium alginate 2.5%, carboxymethyl cellulose sodium 1.5%,

基金中文名称：非常感谢中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)，广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目和广州市科技计划项目(201510010012)对本工作的支持。

*通讯作者：胡云峰，yunfeng.hu@scsio.ac.cn。

enzyme loading 800 U/mL, $CaCl_2$ 5%, EGDE 0.02%, and immobilization time 30 min. Under above optimized conditions, the activity of immobilized lipase was about 380 U/g, and the recovery of the enzyme activity of the immobilized lipase reached about 50.09%. Compared with those from free lipase, the optimal pH (8.0)and temperature (45 ℃) were higher. The thermal stability of immobilized lipase was better than that of free lipase, and the the immobilized lipase could be reused for seven times and still retained about 60% activity.

Key word: sodium alginate; carboxymethyl cellulose sodium; ethylene glycol diglycidyl ether; immobilized enzyme

脂肪酶(Lipase，EC3.1.1.3)是催化甘油酯水解的一类酶的总称，其催化反应通常都具有底物专一性和立体异构专一性，且反应条件较温和，催化效率高，副产物少[1]，被广泛应用到食品、制革、洗涤、制药和环境治理等工业领域[2-4]。随着人们对食品安全的越来越重视，脂肪酶作为一种绿色的生物高效产品，正逐渐替代一些化学添加剂的使用，如脂肪酶与葡萄糖氧化酶复配使用后可替代化学增筋剂溴酸钾[5]，脂肪酶替代传统油脂水解时使用的化学催化剂[6]，酶制剂代替化学保鲜剂实现对食品的保鲜储存，脂肪酶作用于乳制品产生短链脂肪酸，可增加其风味[7]。但由于游离脂肪酶基本都只能一次性使用，在使用过后难以回收利用，使得部分价格较高的脂肪酶难以广泛应用于食品工业领域。因此，将酶固定于某一载体上，在保持其原先催化特性的前提下，实现多次重复使用，显得尤为重要[8, 9]。

酶的固定化方法主要有包埋法、吸附法、交联法[10]、共价结合法等，其中包埋法不需要化学修饰酶蛋白的氨基酸残基，最大程度地保留了酶分子原来的空间构象，使得经过固定化后的酶分子较大程度地保留原来的酶学特性，且固定化后的酶活回收率一般都比较高[11, 12]。实验常用的固定化载体主要有天然高分子材料、合成高分子材料、无机载体、复合载体材料，以及近年来不断开发的新型载体[13, 14]。海藻酸钠是一种较为常用的固定化酶载体，它与氯化钙形成的海藻酸钙凝胶具有含水率高、较成型容易，清洁无毒等优点，但由于其网络孔隙的尺寸较大，凝胶珠机械强度较差，酶分子易从凝胶孔隙中泄露出来，由其制备得到的固定化酶重复使用率不高[15]。因此，本文筛选出羧甲基纤维素钠与海藻酸钠进行复配制备固定化凝胶，同时以 EGDE 交联固定化酶，以弥补单独采用海藻酸钠包埋后固定化酶重复使用率较低的缺点。

EGDE 含有 2 个高活性的环氧端基，可与羟基、氨基、羧基等集团发生反应，

基金中文名称：非常感谢中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)，广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目和广州市科技计划项目(201510010012)对本工作的支持。
*通讯作者：胡云峰，yunfeng.hu@scsio.ac.cn。

多用于环氧树脂的活性稀释、织物整理[16]、PVC 热稳定、树脂改性[17]，交联天然产物壳聚糖[18, 19]、支链淀粉和有机高分子如角蛋白、血红蛋白[20, 21]。Torres 等使用 EDGE 和丙烯酸与水凝胶交联来截留过氧化物酶[22]，Csiffary 等用其聚合物聚乙二醇二缩水甘油醚交联抗坏血酸氧化酶[23]，但尚未见有关 EGDE 及其相关聚合物交联脂肪酶的相关研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 主要材料

脂肪酶购自深圳恒生生物科技有限公司，橄榄油、吡啶、无水醋酸铜购自阿拉丁公司，其它试剂皆为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器

上海世平叠加式摇床 PJS-2012R 摇床；瑞士 Tecan Infinite M200 Pro 酶标仪；SCIENTZ-IID 超声破碎仪；德国 Sartorius DB-10 pH 计； VORTEX QL-902 涡旋振荡器。

1.2 脂肪酶固定化方法

1.2.1 海藻酸钠和 CMC 固定化脂肪酶

按照一定浓度比例将海藻酸钠（1.5%）和 CMC（1%）加热溶解，并搅拌混合均匀，冷却至室温后加入脂肪酶溶液（按照 400 U/mL 复配载体的给酶量），搅拌混合，用注射器逐滴滴加到 5%的氯化钙溶液中，形成光滑小球后置于 4℃硬化一段时间，然后用去离子水冲洗去除凝胶颗粒的表面离子，抽滤除去表面水分，置于 4℃冰箱保存。

1.2.2 固定化酶的交联

采用包埋交联法，在氯化钙溶液中添加一定浓度的交联剂，其它操作同 1.2.1。

1.3 脂肪酶活力测定

游离酶酶活测定：采用改进的铜皂分光光度法测定酶活[24]。

固定化酶酶活测定：只需将加反应体系中的游离酶换成适量的固定化酶即可，其它均与游离酶测定酶活方法相同。

酶活定义：在测定条件下（40℃，pH 8.0），1 min 内催化底物水解产生 1 umol

基金中文名称：非常感谢中国科学院战略性先导科技专项（XDA11030404），广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目和广州市科技计划项目（201510010012）对本工作的支持。
＊通讯作者：胡云峰，yunfeng.hu@scsio.ac.cn。

脂肪酸所需的酶量为一个酶活单位(U)[25]。

1.4 酶活回收率的计算

固定化酶活力回收率(%)=(固定化酶总活力/用于固定化酶的总活力)*100%

2 结果与分析

2.1 海藻酸钠和 CMC 复配包埋法固定化条件筛选

2.1.1 不同载体对脂肪酶固定化的影响[26]

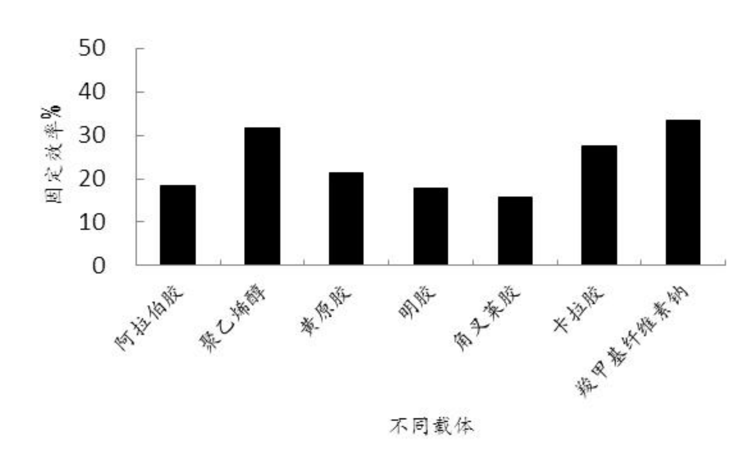


图 1 不同载体对脂肪酶固定化的影响

Fig.1 effect of different carriers on the immobilization of lipase

设定复配载体的总浓度为 2.5%，分别选海藻酸钠-阿拉伯胶（3：2）、海藻酸钠-聚乙烯醇（3：2）、海藻酸钠-黄原胶（3：2）、海藻酸钠-明胶（3：2）、海藻酸钠-角叉莱胶（3：2）、海藻酸钠-卡拉胶（3：2）、海藻酸钠-CMC（3：2）为包埋载体，进行脂肪酶的固定化研究，结果见图 1。由图 1 可知，以海藻酸钠和聚乙烯醇、海藻酸钠和 CMC 为复合载体时，脂肪酶的固定效果最好，酶活回收率分别为 31.73%、33.42%。本实验选择海藻酸钠和 CMC 为复合载体进行后续脂肪酶固定化的研究。

2.1.2 海藻酸钠含量对脂肪酶固定化的影响

海藻酸钠含量过低或过高，都会直接影响酶的固定化效果。设定海藻酸钠的含量为 1.5%～3.5%，CMC 的含量 1%，进行脂肪酶的固定化，结果见图 2a。由图 2a 可知，当海藻酸钠浓度较低时，固定化酶的酶活相对较低，这可能是由于其形成的凝胶网络孔隙较大，较大一部分酶分子并为被很好地截留在凝胶网络空间中而造成的。海藻酸钠含量为 2.0%时，固定化酶有最大酶活，固定效果最好。

基金中文名称：非常感谢中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)，广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目和广州市科技计划项目(201510010012)对本工作的支持。
＊通讯作者：胡云峰，yunfeng.hu@scsio.ac.cn。

随着海藻酸钠浓度继续增大，其粘度增大，难以形成光滑均匀的小球，且形成的小球体积偏大，影响酶与底物的反应[27]。因此，确定海藻酸钠最佳含量为2.0%。

2.1.3 CMC含量对脂肪酶固定化的影响

固定海藻酸钠含量为2.0%，研究不同浓度CMC（0.5%～2.5%）对脂肪酶固定化后酶活的影响(图2b)。由图2b可知，CMC含量为0.75%时，固定化酶易制备，形状较好，且强度适中，此时测得固定化酶有最大酶活。

2.1.4 给酶量对脂肪酶固定化的影响

固定上述最佳条件，设定不同的给酶量（200 U～2000 U）进行试验，研究给其对脂肪酶固定化效果的影响(图2c)。由图2c可知，随着给酶量的不断增加，固定化酶酶活逐渐增大并趋于平稳，但酶活收率却呈下降趋势。综合考虑固定化酶的酶活和酶活收率，确定给酶量为800 U/mL复合载体溶液。

2.1.5 氯化钙浓度对脂肪酶固定化的影响

固定上述最佳条件，分别设定氯化钙溶液浓度为1%～6%，研究氯化钙溶液浓度对脂肪酶固定化效果的影响(图2d)。由图2d可知，氯化钙溶液浓度为5%时，固定化效果最好。因此，确定氯化钙溶液的浓度为5%。

2.1.6 缓冲液pH对脂肪酶固定化效果的影响

固定上述最佳条件，分别设定缓冲液pH为6.0～8.0，研究溶解酶粉的缓冲液pH对脂肪酶固定化效果的影响(图2e)。由图2e可知，随着缓冲液pH的不断增大，固定化酶酶活呈现先上升后下降的趋势，在pH为7的时候固定化酶酶活有最大值。

2.1.7 固定化时间对脂肪酶固定化效果的影响

固定上述最佳条件，分别设定固定化时间为10 min～60 min，研究固定化时间对脂肪酶固定化效果的影响（图2f）。随着固定化时间的延长，固定化酶酶活和酶活收率都呈先上升再下降后趋于平稳的趋势，最佳固定化时间为40 min。

基金中文名称：非常感谢中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)，广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目和广州市科技计划项目(201510010012)对本工作的支持。

*通讯作者：胡云峰，yunfeng.hu@scsio.ac.cn。

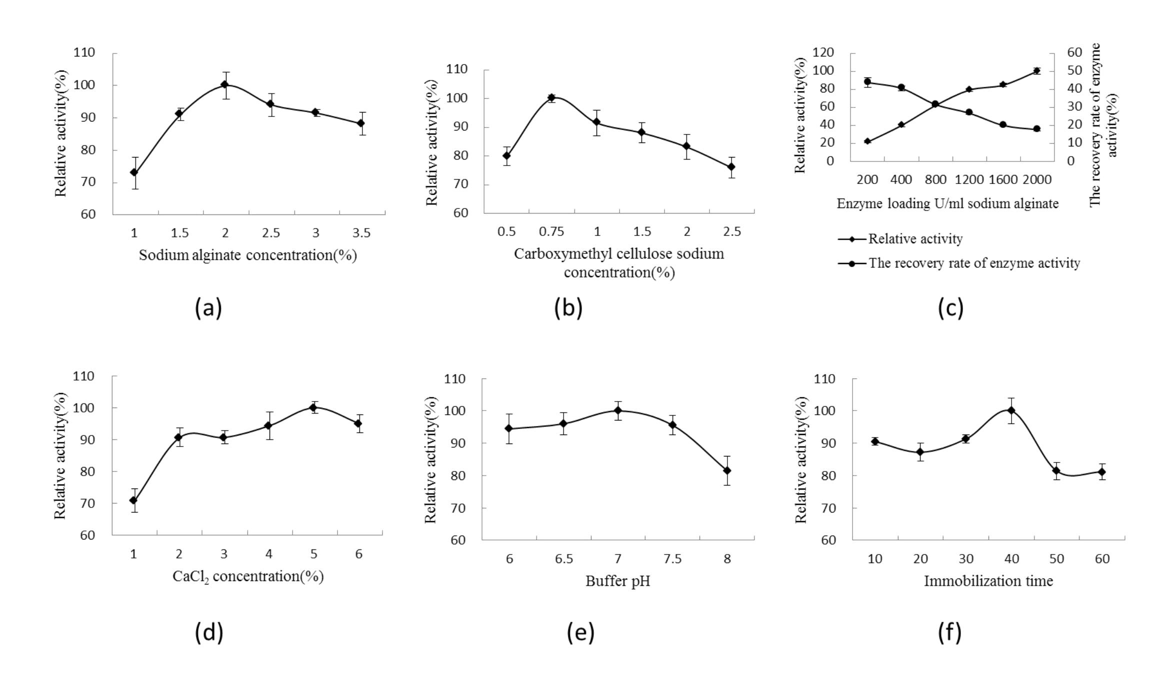


图 2 脂肪酶固定化条件的优化 Fig.2 The optimization of conditions of immobilized lipase

(a. Effect of sodium alginate concentration on the activity of immobilized lipase; b. Effect of carboxymethyl cellulose sodium concentration on the activity of immobilized lipase; c. Effect of enzyme loading on lipase immobilization; d. Effect of $CaCl_2$ concentration on the activity of immobilized lipase; e. Effect of buffer pH on the activity of immobilized lipase; f. Effect of immobilization time on the activity of immobilized lipase)

2.2 脂肪酶固定化条件优化正交试验

根据单因素试验结果，选择对固定化效果影响较大几个的因素，以固定化酶酶活收率为评价指标，设计正交试验，试验结果见表 1。由表 1 可知，最佳固定化酶的制备工艺为 $A_3B_3C_2D_3$，利用最佳组合海藻酸钠含量 2.5%，CMC 含量 1.5%，氯化钙浓度 5%，固定化时间 50 min 进行验证试验，得到固定效率可达 46.35%，说明优化后的固定工艺较最初有较大的改善。

表 1 脂肪酶固定化条件优化正交试验结果与分析

Table 1 Results and analysis of orthogonal experiments for the optimization of immobilized condition of lipase

试验号	A(海藻酸钠浓度%)	B (CMC 浓度%)	C(氯化钙浓度%)	D(固定化时间 min)	固定效率%
1	1（1.5）	1（0.75）	1（4）	1（30）	24.58
2	1	2（1）	2（5）	2（40）	35.61
3	1	3（1.5）	3（6）	3（50）	38.18
4	2（2）	1	2	3	32.09
5	2	2	3	1	33.77
6	2	3	1	2	36.74
7	3（2.5）	1	3	2	30.45
8	3	2	1	3	35.22

基金中文名称：非常感谢中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)，广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目和广州市科技计划项目(201510010012)对本工作的支持。
＊通讯作者：胡云峰，yunfeng.hu@scsio.ac.cn。

9	3	3	2	1	39.34
k1	32.79	29.04	32.18	32.56	
k2	34.20	34.87	35.68	34.27	
k3	35.00	38.09	34.13	35.16	
R	2.21	9.05	3.50	2.60	

2.3 包埋交联法交联固定化酶

2.3.1 交联剂浓度对固定化酶酶活影响

按照上述最佳条件，把一定比例的海藻酸钠、CMC、脂肪酶混合均匀，逐滴滴如含有不同浓度 EGDE（0.01%～0.05%）或戊二醛（0.01%～0.05%）的氯化钙溶液中进行固定化，分别以不加交联剂的样品作为对照，筛选出 EGDE 和戊二醛的最适浓度，结果见图 3a。分析数据得到 EGDE 和戊二醛的最佳交联浓度都为 0.02%。EGDE 的交联效果要优于戊二醛的交联效果。

2.3.2 交联时间对固定化酶酶活影响

按照上述最适交联剂浓度（0.02%），设置交联时间为 20～70 min（间隔 10 min），试验交联时间对固定化酶酶活的影响。由图 3b 和 3c 可知，EGDE 和戊二醛的最适交联时间分别为 30 min 和 40 min。

2.3.3 交联前后固定化酶性质比较

分别在最佳工艺条件下制取不交联、EGDE 交联、戊二醛交联的固定化酶，在 40℃、pH 8.0 的条件下测定其酶活（以不交联的固定化酶酶活为 100%），结果显示 EGDE 交联、戊二醛交联的固定化酶酶活较不交联的固定化酶有较大的提高，分别是其 134%和 118% 。此外，由图 3d 可知，相比较与不交联的固定化酶，EGDE 交联、戊二醛交联的固定化酶重复使用 7 次后的剩余酶活有了较大的提高，说明其交联后的固定化酶机械强度得到了一定的改善。与游离酶相比较，脂肪酶经交联固定化后，在酶活和重复利用上都有了较为显著的提高。

基金中文名称：非常感谢中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)，广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目和广州市科技计划项目(201510010012)对本工作的支持。
＊通讯作者：胡云峰，yunfeng.hu@scsio.ac.cn。

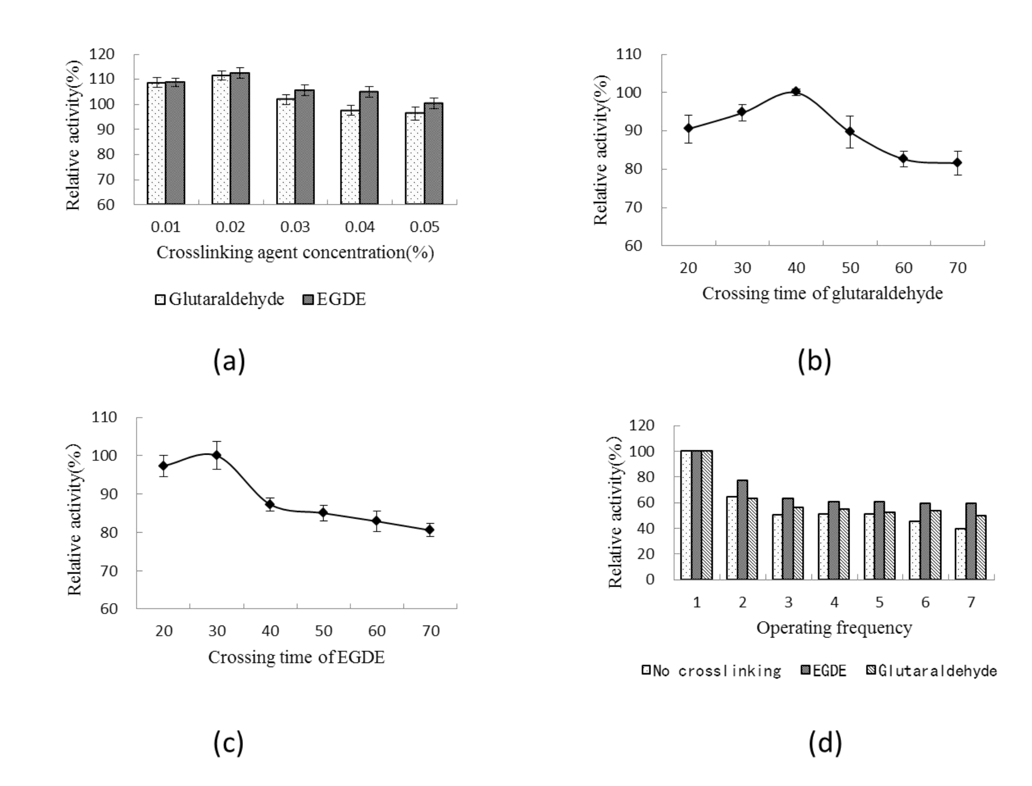


图 3 固定化酶交联条件的优化 Fig.3 The optimization of conditions of crosslinking immobilized lipase

(a. Effect of crosslinking agent on the activity of immobilized lipase; b. Effect of crosslinking time with glutaraldehyde on the activity of immobilized lipase; c. Effect of crosslinking time with EGDE on the activity of immobilized lipase; d. The operation stability of immobilized lipase)

2.4 交联后固定化酶与游离酶的酶学性质比较

2.4.1 固定化酶与游离酶的最适反应 pH

设定酶促反应体系的 pH 为 6～10，40℃条件下测定固定化酶与游离酶的酶活，结果见图 4a。由图 4a 可知，EGDE 交联后固定化酶、戊二醛交联固定化酶和游离酶的最适反应 pH 分别为 8.5、8.0 和 8.0。相比较于游离酶和戊二醛交联固定化酶，EGDE 交联固定化酶反应体系的最适 pH 向碱性方向偏移，pH 在 8.0～9.0 之间时，显示出较高的酶活性。

2.4.2 固定化酶与游离酶的最适反应温度

在最适反应 pH 条件下，分别测定固定化酶和游离酶的最适反应温度，结果见图 4b。由图 4b 可知，游离酶都在 25℃～40℃范围内酶活力随着温度的升高逐渐增大，在 40℃时有最大值，随后温度逐渐升高而酶活随之降低；游离酶被海藻酸钠和 CMC 复配包埋后，EDGE 和戊二醛交联的固定化酶最适反应温分别为 45 和 40℃，与游离酶相比变化不大，但两者随着反应温度继续升高时，其活性明显高于游离酶，这可能是 CMC 与海藻酸钠形成的空间结构对脂肪酶的空间结

基金中文名称：非常感谢中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)，广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目和广州市科技计划项目(201510010012)对本工作的支持。
＊通讯作者：胡云峰，yunfeng.hu@scsio.ac.cn。

构形成了保护，从而使其在温度较高的反应体系中仍能发挥较大的催化能力。

2.3.3 固定化酶与游离酶的热稳定性

以放置在 4℃冰箱的游离酶和固定化酶作为对照，测定游离酶和固定化酶在不同温度（40～65℃）水浴 30 min 后的剩余酶活，结果见图 4c。由图 4c 可知，在 40～55℃条件下，固定化酶和游离酶酶活下降趋势相对较为平缓，当温度超过 55℃后，游离酶和戊二醛交联固定化酶酶活迅速下降，在 65℃放置 30 min 后酶活仅剩最初的 13%和 15%，EGDE 交联固定化酶在高温条件下的耐受性优于前两者，其在 65℃处理后仍能保持 28%的剩余酶活。

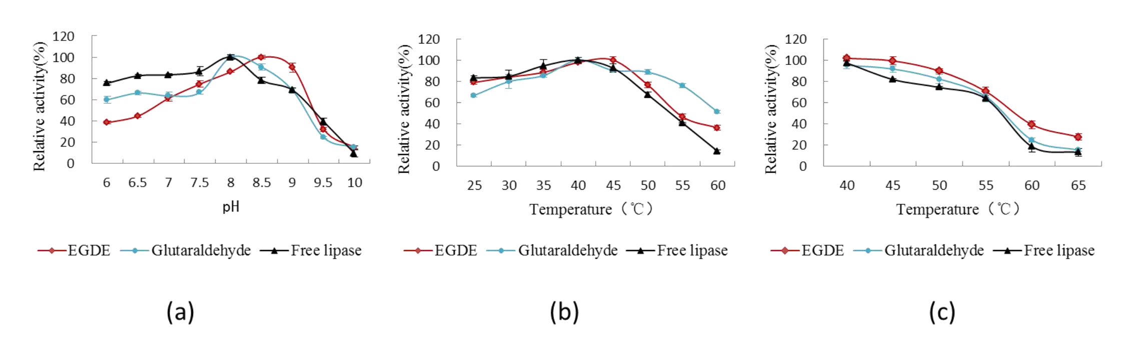


图 4 固定化酶与游离酶酶学性质比较 Fig.4 The properties of immobilized and free lipase

(a) Optimal reaction pH of immobilized and free lipase; (b) Optimal reaction temperature of immobilized and free lipase; (c) Thermal stability of immobilized and free lipase)

3 小结

本实验采用海藻酸钠和 CMC 复配包埋，并采用乙二醇缩水甘油醚（EGDE）包埋交联，对脂肪酶的固定化进行了研究，经单因素试验和正交试验优化对固定化条件后，得到得到最佳固定化条件为海藻酸钠浓度 2.5%，CMC 浓度 1.5%，给酶量 800 U/ml 载体溶液，氯化钙浓度 5%，缓冲液 pH 7.0，EGDE 浓度 0.02%，在此条件下固定 30 min，固定化脂肪酶酶活大约为 380 U /g，酶活收率 50.09%。同时，对固定化酶和游离酶的酶学性质进行了比较，固定化酶最适反应温度和 pH 都比游离酶有所增大，热稳定性得到改善，且重复利用率明显优于游离酶，重复使用 7 次后仍保持 60%左右的相对酶活。相较于单独采用海藻酸钠包埋得到的脂肪酶，本实验制得的固定化酶在酶活、热稳定性以及重复使用率等性能上都有较为明显的提高，因而降低了脂肪酶的使用成本，为脂肪酶更广泛地应用到工业生产领域提供了实验基础。

此外，本实验将新型环氧交联剂 EGDE 与实验常用交联剂戊二醛对比使用，

基金中文名称：非常感谢中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)，广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目和广州市科技计划项目(201510010012)对本工作的支持。

＊通讯作者：胡云峰，yunfeng.hu@scsio.ac.cn。

发现 EGDE 不仅具有与戊二醛类似的使海藻酸钠—CMC 分子内和分子间形成交联，从而提高固定化酶机械强度的功能，而且从酶活和重复使用情况来比较，其交联效果明显优于戊二醛。这一发现说明新型环氧交联剂 EGDE 可作为酶固定化的交联剂来使用，能较大程度地保持酶活性甚至有促进酶活的作用，且得到的固定化酶重复性能好，为新型环氧交联剂 EGDE 在工业酶固定化中的使用提供了参考依据。

参考文献

［1］刘自琴. 脂肪酶和胰蛋白酶的固定化及共固定化研究. 广州:华南理工大学,2012:12

Liu Z Q. A study on immobilization of lipase and trypsin and their co-immobilization. Guangzhou: South China University of Technology,2012:12

［2］Hemachander C, Puvanakrishnan R. Lipase from Ralstonia pickettii as an additive in laundry detergent formulations. Process Biochemistry, 2000, 35(8): 809-814

［3］Jaeger K E, Eggert T. Lipases for biotechnology. Curr Opin Biotechnol, 2002, 13(4): 390-397.

［4］Nagao T, Shimada Y, Sugihara A, et al. Use of thermostable Fusarium heterosporum lipase for production of structured lipid containing oleic and palmitic acids in organic solvent-free system. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2001, 78(2): 167-172

［5］李庆龙. 面粉工业的发展与酶制剂的应用前景. 西部粮油科技, 2001, 26(1): 3-10

Li Q L. The development of flour industy and application prospect of agent medium. China Western Cereals & Oils Technology, 2001, 26(1): 3-10

［6］刘海洲, 吴小飞, 牛佰慧, 等. 脂肪酶在食品工业中的应用与研究进展. 粮食加工, 2008, 33(5): 55-57

Liu H Z, Wu X F, Niu B H, et al. The application of lipase in food industy and progress. Grain Processing,2008, 33(5): 55-57

［7］Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their industrial applications: an overview. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004, 118(1-3): 155-170

［8］Degroot A R, Neufeld R J. Encapsulation of urease in alginate beads and protection from α-chymotrypsin with chitosan membranes. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 29(6): 321-327

［9］袁勤生. 现代酶学. 第二版. 上海:华东理工大学出版社, 2007.245.

Yuan Q S. Modern Enzymology. The second edition. Shanghai: East China University of Science and Technology press, 2007.245

［10］Fernando L G, Lorena B, Cesar M, et al. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. J Biotechnol, 2005, 119:70-75

［11］Powell L W. Decelopments in immobilized-enzyme technology. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 1984, 2(1): 409-438

［12］徐莉, 侯红萍. 酶的固定化方法的研究进展. 酿酒科技, 2010, (1): 86-89

Xu L, Hou H P. Research progress in the immobilization enzyme. Liquor-Making Science & Technology, 2010, (1): 86-89

基金中文名称：非常感谢中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)，广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目和广州市科技计划项目(201510010012)对本工作的支持。

*通讯作者：胡云峰，yunfeng.hu@scsio.ac.cn。

［13］Tosa T, Mori T, Fuse N, et al. Studies on continuous enzyme reactions Part V kinetic and industrial application of aminoacylase column for continuous optical resolution of acyl-dl-amino acids. Biotechnol and Bioengineering, 1967, 9(4): 603-615

［14］袁定重，张秋禹，侯振宇，等．固定化酶载体材料的最新研究进展．材料报道，2006, 20(1): 69-72

Yuan D C, Zhang Q Y, Hou Z Y, et al. The latest research advance of immobilized enzyme carriers. Materials Review, 2006, 20(1): 69-72

［15］雷生姣，王可兴，吕晓燕，等．聚乙烯醇-海藻酸钙固定化柚苷酶．食品科学, 2011, 32(3): 138-143

Lei S J, Wang K X, Lv X Y, et al. Immobilization of naringinase on PVA-calcium alginate gel. Food Science, 2011, 32(3): 138-143

［16］Tanabe T, Okitsu N, Yamauchi K. Fabrication and characterization of chemically cross-linked keratin films. Materials Science and Engineering C, 2004, 24(3): 441-446

［17］Bershtein V A, Egorova L M, Yakushev P N, et al. Hyperbranched polyimides crosslinked with ethylene glycol diglycidyl ether: Glass transition dynamics and permeability. Polymer, 2006, 47(19): 6765-6772

［18］王宇，高建峰，胡拖平，等．乙二醇双缩水甘油醚交联壳聚糖印迹材料对稀土中Cu(Ⅱ)的选择性吸附．材料报道, 2016, 30(2): 29-32

Wang Y, Gao J F, Hu T P, et al. Selective adsorption properties ethylene glycol bis glycerol ether crosslinked chitosan imprinted material towards Cu(Ⅱ) in rare earth. Materials Review, 2016, 30(2): 29-32

［19］Jozwiak T, Filipkowska U, Szymczyk P, et al. Effect of ionic and covalent crosslinking agents on properties of chitosan beads and sorption effectiveness of Reactive Black 5 dye[J]. Reactive & Functional Polymers, 2017, 114: 58-74

［20］徐宇红，路秀玲，郑春阳，等．乙二醇二缩水甘油醚交联血红蛋白的反应优化．高校化学工程学报, 2006, 20(3): 401-406

Xu Y H, L X L, Zheng C Y, et al. Optimizing the reaction process of cross-linking ethyllene glycol diglycidyl ether with hemoglobin. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2006, 20(3): 401-406

［21］张娅，许涌深，邱守季，等．乙二醇二缩水甘油醚的合成及表征．化学工业与工程, 2014, 31(5): 31-36

Zhang Y, Xu Y S, Qiu S J, et al. Preparation and characterization of glycol diglycidyl etheri. Chenmical Industry and Engineering, 2014, 31(5): 31-36

［22］Torres D I, Miranda M V, Dall' Orto V C. One-pot preparation of SBP-PANI-PAA-ethylene glyco diglycidyl ether sensor for electrochemical detection of H2O2[J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2017, 239: 1016-1025

［23］Csiffary G, Futo P, Adanyi N, eal. Ascorbate Oxidase-Based Amperometric Biosensor for L-Ascorbic Acid Determination in Beverages[J]. Food Technology and Biotechnology, 2016, 54(1): 31-35

［24］侯爱军，徐冰斌，梁亮，等．改进铜皂-分光光度法测定脂肪酶活力．皮革科学与工程, 2011, 21(1): 22-27

Hou A J, Xu B B, Liang L, et al. A modified colorimetric assay of lipase activity using emulsified olive oil as the substrate. Leather Science and Engineering, 2011, 21(1): 22-27

［25］高阳，谭天伟，聂开立，等．大孔树脂固定化脂肪酶及在微水相中催化合成生物

基金中文名称：非常感谢中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)，广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目和广州市科技计划项目(201510010012)对本工作的支持。

＊通讯作者：胡云峰，yunfeng.hu@scsio.ac.cn。

柴油的研究. 生物工程学报, 2006, 22(1): 114-118

Gao Y, Tan T W, Nie K L, et al. Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22(1): 114-118

［26］虞凤慧, 马韵升, 刘圣鹏, 等. 海藻酸钠与羧甲基纤维素钠固定化高温碱性脂肪酶. 中国酿造, 2015, 34(5): 78-81

Yu F H, Ma Y S, Liu S P, et al. Immobilization of high-temperature alkaline lipase by sodium alginate and carboxymethyl cellulose sodium. China Brewing, 2015, 34(5): 78-81

［27］郑璐, 雷明科, 张瑞, 等. 海藻酸钠固定化α－淀粉酶的研究. 湖北农业科学, 2013, 52(23): 5845-5849

Zheng L, Lei M K, Zhang R, et al. Studies on immobilizing α－amylase sodium alginate. Hubei Agricultural Science, 2013, 52(23): 5845-5849

基金中文名称：非常感谢中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)，广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目和广州市科技计划项目(201510010012)对本工作的支持。

＊通讯作者：胡云峰，yunfeng.hu@scsio.ac.cn。